

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-284389

(43) 公開日 平成7年(1995)10月31日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/12				
C 1 2 P 19/02		7432-4B		
19/12		7432-4B		
// (C 1 2 N 9/12				
C 1 2 R 1:265)				
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 11 頁)				

(21) 出願番号	特願平7-11205	(71) 出願人	000002934 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(22) 出願日	平成7年(1995)1月27日	(72) 発明者	木沢 秀樹 茨城県つくば市春日1丁目7番地の9 武 田春日ハイツ1303号
(31) 優先権主張番号	特願平6-24121	(72) 発明者	宮川 権一郎 大阪府豊能郡豊能町東ときわ台6丁目6番 地の11
(32) 優先日	平6(1994)2月22日	(72) 発明者	杉山 良雄 兵庫県高砂市伊保3丁目18番3号
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 岩田 弘 (外5名)

(54) 【発明の名称】 新規トレハロースホスホリラーゼおよびその製造法

(57) 【要約】

【目的】細菌由来の新規トレハロースホスホリラーゼの提供。

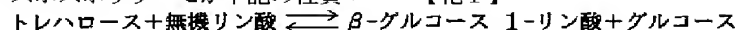
【構成】ミクロコッカス属菌由来のトレハロースホスホリラーゼ。

【効果】本発明のトレハロースホスホリラーゼは、ゲルろ過的および電気泳動的に単一であり、短時間に効率よく製造することができる。また本発明のトレハロースホスホリラーゼは、基質特異性が極めて高く高純度であるため副反応がほとんどなく、トレハロースの選択的定量に用い得る。また本酵素の逆反応を利用して産業上有用な物質であるトレハロースを極めて高収率で製造し得る。さらに本酵素の正反応を利用して、高価な試薬であるβ-グルコース 1-リン酸を製造し得る。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】ミクロコッカス属菌由来のトレハロースホスホリラーゼ。

【請求項2】トレハロースホスホリラーゼが下記の性質\*



〔式中、右向き矢印は正反応を、左向き矢印は逆反応を示す〕で表される反応を触媒する。

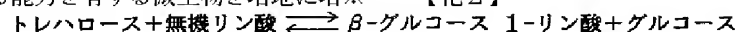
## ②基質特異性

本酵素は正反応において、トレハロースを基質とするが、ネオトレハロース、マルトース、イソマルトース、ラクトース、ラミナリビオース、シュークロース、スターチおよびグリコーゲンのいずれをも基質としない。本酵素は逆反応において、 $\beta$ -グルコース 1-リン酸およびグルコースを基質とするが、 $\alpha$ -グルコース 1-リン酸、グルコース 6-リン酸、 $\alpha$ -ガラクトース 1-リン酸、フルクトース 1-リン酸、フルクトース 6-リン酸、ガラクトース、マンノース、フルクトース、キシロース、ラムノース、リボース、アラビノース、ソルビトール、グルコサミン、N-アセチルグルコサミン、3-O-メチルグルコース、2-デオキシグルコース、グルコノ- $\delta$ -ラクトンおよびグルクロン酸のいずれをも基質としない。

## ③至適pHおよびpH安定性

正反応における本酵素の至適pHは約6.0~7.5、安定pH範囲は約4℃、24時間の処理でpH約5.5~7.5、逆反応における本酵素の至適pHは約5.8~7.0、安定pH範囲は約4℃、24時間の処理でpH約6.3~7.3。

【請求項3】ミクロコッカス属に属し、トレハロースホスホリラーゼを産生する能力を有する微生物を培地に培※



〔式中、右向き矢印は正反応を、左向き矢印は逆反応を示す〕で表される反応を触媒する。自然界において本酵素を有する生物は、僅かにユーグレナ グラチリス (*Euglena gracilis*) [バイオケミストリー・アンド・バイオフィジオリジー・アクタ (Biochim. Biophys. Acta.)、第198巻、151-154頁(1970)、ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)、第247巻、3223-3228頁(1972)]、フラムリナ ベルチペス (*Flammulina velutipes*) [エフィーエムエス・マイクロバオイロロジー・レターズ (FEMS Microbiol. Lett.)、第55巻、147-150頁(1988)] およびブラジリゾビウム ジャポニカム (*Bradyrhizobium japonicum*) [プラント・フィジオリジー (Plant Physiol.)、第81巻、538-541頁(1986)] で知られている。このうち前二者由来の酵素は既に部分精製されているが、トレハロースホスホリラーゼをこれらの菌体内に充分量産生させるには長期間の培養が必要であり、かつ酵素生産量も満足できない。即ち、ユーグレナ グラチリスの場合、煩雑な前培養の後、光照射下6日間培養して得られる酵素は、酵素活性として無細胞抽出液中0.003単位/mgタンパク質に過ぎない。ま★50

\*を有する請求項1記載のトレハロースホスホリラーゼ。

## ①作用

## 式

## 【化1】

※養し、該酵素を生成・蓄積せしめ、培養物より該酵素を採取することを特徴とするトレハロースホスホリラーゼの製造法。

【請求項4】微生物がミクロコッカス バリアンスである請求項3記載の製造法。

【請求項5】微生物がミクロコッカス バリアンス N O. 39株である請求項3記載の製造法。

【請求項6】 $\beta$ -グルコース 1-リン酸およびグルコースを請求項1記載のトレハロースホスホリラーゼを用いる酵素反応に付すことを特徴とするトレハロースの製造法。

【請求項7】トレハロースを請求項1記載のトレハロースホスホリラーゼを用いる酵素反応に付すことを特徴とする $\beta$ -グルコース 1-リン酸の製造法。

20 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、新規トレハロースホスホリラーゼ〔 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース (trehalose) : オルソホスフェート (orthophosphate)・ $\beta$ -D-グルコシルトランスフェラーゼ (glucosyltransferase)〕およびその製造法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】トレハロースホスホリラーゼは式

## 【化2】

★た、フラムリナ ベルチペスの場合、酵素活性として無細胞抽出液中0.02から0.05単位/mgタンパク質の酵素を得るために、14から16日間の極めて長い培養時間を要する。また、ブラジリゾビウム ジャポニカムのトレハロースホスホリラーゼについてはその存在が知られているにすぎない。即ち、これら既知の酵素およびそれらの製造法はいずれも産業的利用の観点からは満足できるものではなかった。

## 【0003】

40 【発明が解決しようとする課題】本発明は、細菌由来の新規トレハロースホスホリラーゼ、その製造法および用途の提供を目的とする。

## 【0004】

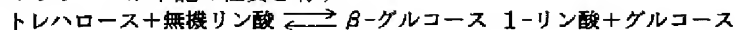
【課題を解決するための手段】本発明者らは、このような事情に鑑み、培養が容易で生育時間も短い細菌の中から、新規のトレハロースホスホリラーゼ産生菌を求めて鋭意研究を続けた結果、従来トレハロースホスホリラーゼを産生することが全く知られていなかったミクロコッカス属の細菌がトレハロースホスホリラーゼを産生することを見出し、この知見に基づいて更に研究を重ね、本

発明を完成した。

【0005】即ち、本発明は、

(1) ミクロコッカス属菌由来のトレハロースホスホリラーゼ、

(2) トレハロースホスホリラーゼが下記の性質を有す\*



〔式中、右向き矢印は正反応を、左向き矢印は逆反応を示す〕で表される反応を触媒する。

#### ②基質特異性

本酵素は正反応において、トレハロースを基質とするが、ネオトレハロース、マルトース、イソマルトース、ラクトース、ラミナリビオース、シュークロース、スターチおよびグリコゲンのいずれをも基質としない。本酵素は逆反応において、 $\beta$ -グルコース 1-リン酸およびグルコースを基質とするが、 $\alpha$ -グルコース 1-リン酸、グルコース 6-リン酸、 $\alpha$ -ガラクトース 1-リン酸、フルクトース 1-リン酸、フルクトース 6-リン酸、ガラクトース、マンノース、フルクトース、キシロース、ラムノース、リボース、アラビノース、ソルビトール、グルコサミン、N-アセチルグルコサミン、3-O-メチルグルコース、2-デオキシグルコース、グルコノ- $\delta$ -ラクトンおよびグルクロン酸のいずれをも基質としない。

#### ③至適pHおよびpH安定性

正反応における本酵素の至適pHは約6.0~7.5、安定pH範囲は約4℃、24時間の処理でpH約5.5~7.5、逆反応における本酵素の至適pHは約5.8~7.0、安定pH範囲は約4℃、24時間の処理でpH約6.3~7.3。

(3) ミクロコッカス属に属し、トレハロースホスホリラーゼを産生する能力を有する微生物を培地に培養し、該酵素を生成・蓄積せしめ、培養物より該酵素を採取することを特徴とするトレハロースホスホリラーゼの製造法、

(4) 微生物がミクロコッカス バリアンスである上記※

\* 上記(1)記載のトレハロースホスホリラーゼ、

①作用

式

【化3】

※(3)記載の製造法、

(5) 微生物がミクロコッカス バリアンス No. 39株である上記(3)記載の製造法、

10 (6)  $\beta$ -グルコース 1-リン酸およびグルコースを上記(1)記載のトレハロースホスホリラーゼを用いる酵素反応に付すことを特徴とするトレハロースの製造法および

(7) トレハロースを上記(1)記載のトレハロースホスホリラーゼを用いる酵素反応に付すことを特徴とする $\beta$ -グルコース 1-リン酸の製造法に関する。

【0006】本発明に用いられるミクロコッカス属菌としては、ミクロコッカス属に属しトレハロースホスホリラーゼを産生する能力を有する微生物であれば、いかなる微生物であつてもよい。該微生物の好ましい例としては、例えばミクロコッカスバリアンスが挙げられる。最も好ましい具体例としては、例えば茨城県の土壌より分離したミクロコッカス ヴァリアンス(Micrococcus varians) No. 39株を挙げることができる。本菌は、1993年2月26日から財団法人発酵研究所(IFO)にIFO 15442として、また、1993年3月10日から通商産業省工業技術院生命工学研究所にFERMBP-4238として寄託されている。本菌を用いれば、1日の培養で無細胞抽出液中0.06単位/mgタンパク質の酵素を産生することができる。ミクロコッカスバリアンス No. 39株の菌学的性質を〔表1〕に示す。

【0007】

【表1】

トレハロースホスホリラーゼ生産菌No. 39株の分類学的性状

項目	性状	項目	性状
グラム染色性	陽性	ポリオキシエチレンソルビタールモノステアートの加水分解	陰性
形態	球菌	クエン酸の利用 (シモンズの培地)	陽性
菌の大きさ	0.9-1.0 $\mu$ m	無機窒素源の利用	陰性
運動性	なし	糖類からの酸生成	
色調	淡黄色	グルコース	陽性
カタラーゼ	陽性	フルクトース	陽性
オキシダーゼ	陰性	ガラクトース	陽性
脂体脂肪酸	ai-15:0val-17:0	マンノース	陰性
	(No hydroxy acids)	キシロース	陽性
ペプチドグリカンのアミノ酸組成	グルタミン酸: リジン: アラニン	ラムノース	陰性
	-1.00: 0.97: 5.80	マルトース	陽性
(ペプチドグリカン・タイプ)	L-Lys-1-Ala3-4	ラクトース	陰性
	(A3e, A11.7)	シュクロース	陽性
メナキノン	NR-7 (H <sub>2</sub> )	トレハロース	陽性
G+C含量	69.9 (mol %)	グリセロール	陰性
ウレアーゼ	陽性	ソルビトール	陰性
$\beta$ -ガラクトシダーゼ	陽性	生育温度範囲	20-37 $^{\circ}$ C
ホスファターゼ	陰性	最適生育温度	30 $^{\circ}$ C
アルギニンジヒドロラーゼ	陰性	酸素に対する態度	好気性
アセトインの生成	陰性	塩化ナトリウム含有培地上での生育	
硝酸塩の還元	陽性	10%	陽性
ゼラチンの加水分解	陽性	15%	陰性
デンプンの加水分解	陰性	リゾチーム含有培地上での生育	
エスキリンの加水分解	陰性	400 $\mu$ g/ml	陽性
		800 $\mu$ g/ml	陰性

【0008】〔表1〕中、ai はアンテイズ(anteiso)を示す。

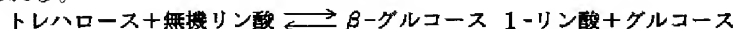
マイクロコッカス ヴァリアンス (Micrococcus varians) No. 39株に自体公知の方法 (例、紫外線を照射する方法、変異誘起剤による方法等) により人為的に変異を誘起させた株であっても、それがマイクロコッカス (Micrococcus) 属に属し、トレハロースホスホリラーゼを生産する能力を有するものであれば本発明に用い得る。本発明におけるマイクロコッカス属細菌の培養に用いる培地は、該細菌が生育し得る通常の組成のものでよい。種々の炭素源、窒素源を選択することができ、これらのほかに無機塩類およびビタミン類等の生育に必須ないしは促進物質を添加することが好ましい。炭素源としては、グルコース、トレハロース、マルトース、シュクロー

\* ス、フラクトース、澱粉、粗糖、蔗糖蜜等の糖類、グリセロール、ソルビトール等の糖アルコール類、および各種有機酸類 (例、酢酸、クエン酸等) などがそれぞれ単独または適宜の割合に混合して用いられる。これらの炭素源は、所定の濃度になるように、初めから培地に添加してもよく、培養中に分割添加してもよい。窒素源としては、ペプトン、大豆粉、コーンステープリカー (CSL)、酵母エキス、肉エキス、尿素等の有機窒素源の他、硫酸、硝酸、塩酸、炭酸、リン酸等のアンモニウム塩、アンモニア水、アンモニアガスなどの無機窒素源がそれぞれ単独または適宜の割合に混合して用いられる。無機塩類としては、例えば無機酸 (例、硫酸、塩酸、炭酸、硝酸、リン酸等) の金属 (例、カルシウム、カリウム、ナトリウム、マグネシウム、マンガン、鉄、銅、亜

鉛等)塩、有機酸(例、酢酸、乳酸等)の金属(例、カルシウム、カリウム、ナトリウム、マグネシウム、マンガ、鉄、銅、亜鉛等)塩等が必要に応じてそれぞれ単独あるいは適宜組み合わせ用いられる。

【0009】本発明に用いられるマイクロコッカス属菌は、その生育にニコチンアミド、チアミン、ビオチン、パラアミノ安息香酸等のビタミン類の一ないしは複数を要求するので、これらビタミン類は培地成分として必須である。このため、培地にはこれらビタミン類もしくはその誘導体あるいは、これらビタミン類を含有する微生物菌体やその抽出物等が添加される。該ビタミン類としては、例えばマイクロコッカス バリアンス No. 39株の場合、ニコチンアミド、チアミン、ビオチンおよびパラアミノ安息香酸が用いられる。さらに生育を促進する目的で各種のビタミン類やアミノ酸類を必要に応じて添加してもよい。該ビタミン類の添加量は、用いる菌種、培養温度等により適宜選択される。具体的には、例えばマイクロコッカス バリアンス No. 39株の場合、培地1L当たり、少なくともニコチンアミドを約40μg、チアミンを約40μg、ビオチンを約5μgおよびパラアミノ安息香酸を約20μg添加することが必要である。さらに培養開始時あるいは培養中に、消泡を目的として培地にシリコンオイル等の消泡剤を添加するのも効果的である。

【0010】培養は通常、振盪または通気攪拌培養等の好気的条件下に行うのがよい。培地のpHは通常約4~9の範囲がよく、とりわけ約5~8の範囲が好ましい。pHをこの範囲に保つために、あらかじめ培地に緩衝液(例、リン酸緩衝液等)やアルカリ土類金属炭酸塩(例、炭酸カルシウム等)を加えておいてもよいし、培養中にpHが所定の値を下回った時には、水酸化アルカリ金属(例、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等)、アンモニア水、アンモニアガス等を添加し、逆にpHが所定の値を上回った時には、塩酸、硫酸等の鉱酸または酢酸、クエン酸等の有機酸を添加してpHを調整してもよい。培養の温度は、使用する菌株の生育に好適な温度が適宜選択される。具体的には、例えば約20~50℃、好ましくは約25~40℃の範囲である。培養時間は、単位培養液量当りのトレハロースホスホリラーゼ生産量が最大に達するまで培養すればよい。通常約18~36時間\*でその目的は達せられる。



〔式中、右向き矢印は正反応を、左向き矢印は逆反応を示す〕で表される反応を触媒する。

#### 【0015】②基質特異性

本酵素は正反応において、トレハロースを基質とするが、ネオトレハロース、マルトース、イソマルトース、ラクトース、ラミナリビオース、シュークロース、スターチおよびグリコーゲンのいずれをも基質としない。本酵素は逆反応において、β-グルコース 1-リン酸およ

\*【0011】上記の方法で培養することにより、本酵素は主として菌体内に蓄積される。培養終了後は培養物から本発明のトレハロースホスホリラーゼを自体公知の方法により採取する。該採取法としては、通常の酵素精製法が用い得る。具体的には、例えば遠心分離等により菌体を集め、超音波処理、ダイノミル等の物理的方法によって菌体を破砕後、遠心分離等により細胞片等の固形物を除き、無細胞抽出液を得る。この後、硫酸アンモニウム分画、硫酸プロタミンまたは硫酸ストレプトマイシン処理等による除核酸、TSKgel DEAE-5PW、DEAE-トヨパール650M(いずれも東ソー社製)等によるイオン交換クロマトグラフィーおよびTSKgel G4000SW(東ソー社製)、Asahipak GS-620(旭化成社製)等によるゲルろ過クロマトグラフィーを適宜組み合わせることによって電気泳動的に均一に精製されたトレハロースホスホリラーゼ標品を得ることができる。なお酵素の精製は正逆どちらの酵素活性を指標に行ってもよいが、正反応側の酵素活性を指標にして行う方が簡便である。

【0012】該酵素を用いる酵素反応には、このようにして得られた精製酵素を用いることが好ましい。しかし、場合によっては、粗製酵素を用い得る。さらに菌体を有機溶媒(例、トルエン等の芳香族炭化水素類など)、界面活性剤(例、トリトンX-100など)等で処理、あるいは凍結融解等で処理をしたいわゆるパーミアライズド・セル(permealized cell)をそのまま酵素源として用いることもできる。また、本発明のトレハロースホスホリラーゼを固定化して用いることも有効である。該固定化は、例えば支持体(例、プラスチック、布等)に該酵素を固定化せしめることにより行われる。固定化の方法は、自体公知の方法(例、担体結合法、架橋法、包括法等)により行うことができる。具体的には、例えば微孔性プラスチックシートをポリエチレンイミンおよびグルタルアルデヒドで処理して、酵素タンパク質のアミノ基との間に化学結合を形成し、固定化することができる。

【0013】次に上記精製手段により得られた本酵素の性質を以下に記載する。

#### ①作用

#### 【0014】式

#### 【化4】

※β-グルコースを基質とするが、α-グルコース 1-リン酸、グルコース 6-リン酸、α-ガラクトース 1-リン酸、フルクトース 1-リン酸、フルクトース 6-リン酸、ガラクトース、マンノース、フルクトース、キシロース、ラムノース、リボース、アラビノース、ソルビトール、グルコサミン、N-アセチルグルコサミン、3-O-メチルグルコース、2-デオキシグルコース、グルコノδ-ラクトンおよびグルクロン酸のいずれをも基質とし

ない。

【0016】③至適pHおよびpH安定性

正反応における本酵素の至適pHは約6.0~7.5、安定pH範囲は約4℃、24時間の処理でpH約5.5~7.5、逆反応における本酵素の至適pHは約5.8~7.0、安定pH範囲は約4℃、24時間の処理でpH約6.3~7.3。

④至適温度および温度安定性

本酵素の正反応における至適温度は32℃付近であり、安定温度範囲はpH 7.0、10分間の処理で30℃以下である。逆反応における至適温度、および安定温度範囲は正反応の場合とほぼ同じである。

⑤阻害、活性化および安定化

本酵素における正反応は1 mMの $\text{Cu}^{2+}$ により約80%活性が阻害される。また10 mMのバリダマイシン A、0.2 mMのバリドキシルアミン A、または1 mMの1-デオキシノジリマイシンによりほぼ100%活性が阻害される。逆反応は1 mMの $\text{Ni}^{2+}$ により約90%、 $\text{Zn}^{2+}$ または $\text{Cu}^{2+}$ によりほぼ100%活性が阻害される。

【0017】⑥分子量

TSKgel G4000SWカラム（東ソー社製）、およびAsahipak GS-620カラム（旭化成社製）を用いたゲルろ過法で測定して得られた本酵素の分子量は約58万、および約57万である。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で求めたサブユニットの分子量は約10万5千である。

⑦等電点

等電点ゲル電気泳動法により求めた本酵素の等電点は4.8である。

⑧ミカエリス定数 ( $K_m$ )

本酵素のトレハロース、無機リン酸、 $\beta$ -グルコース 1-リン酸、およびグルコースに対する $K_m$ は各々10、3.1、38、および23 mMである。

【0018】なお、本酵素の活性測定は以下に記載する方法で行った。まず正反応側の酵素活性について説明する。トレハロース 200  $\mu\text{mol}$ 、リン酸一カリウム-リン酸二カリウム緩衝液 (pH 7.0, 50  $\mu\text{mol}$ )、N-トリス (ハイドロキシメチル) メチル-2-アミノエタンスルホン酸 (N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethane sulfonic acid) -水酸化カリウム緩衝液 (以下、TES-KOHと略記することもある、pH 7.0, 50  $\mu\text{mol}$ ) および酵素液を含む反応液1.0 mlを30℃で15分間反応させる。反応は沸騰水中で2分間加熱することによって停止させる。この反応液中に遊離したグルコースをグルコースオキシダーゼとペルオキシダーゼを用いるグルコスタット法で定量する。ただし、基質としてシュクロース、スターチ、およびグリコーゲンを用いたときは、遊離した $\beta$ -グルコース 1-リン酸量の測定により活性を求める。 $\beta$ -グルコース 1-リン酸の定量はマッククレディー (McCready) らの方法 [メソーズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology, 第3巻, 137-143 頁, アカデミック・プレス (Academic Press) 刊, ニュ

ー・ヨーク (New York) (1962), 米国) に従い、 $\beta$ -グルコース 1-リン酸が酸加水分解されて生じた無機リン酸量をモリブデンブルー直接法で定量する。逆反応については、グルコース 20  $\mu\text{mol}$ 、 $\beta$ -グルコース 1-リン酸 20  $\mu\text{mol}$ 、TES-KOH (pH 7.0, 10  $\mu\text{mol}$ ) および酵素液を含む反応液0.2 mlを30℃で15分間反応させた後、遊離した無機リン酸量をモリブデンブルー直接法で定量する。酵素活性1単位 [ユニット (unit)] とは、この条件で1分間に1 マイクロモル ( $\mu\text{mol}$ ) のグルコース (または $\beta$ -グルコース 1-リン酸) または無機リン酸を遊離させる酵素量と定義する。

【0019】本発明のトレハロースホスホリラーゼは、食品、医薬品、化粧品等の幅広い分野で保存剤等としての応用が期待されているトレハロース [O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル (glucopyranosyl) -(1 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -D-グルコピラノシド (glucopyranoside) の製造用酵素として、生化学用試薬である $\beta$ -グルコース 1-リン酸の製造用酵素として、あるいはグルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼと共役させることによりトレハロースの定量用試薬として利用し得る。 $\beta$ -グルコース 1-リン酸およびグルコースを本発明のトレハロースホスホリラーゼを用いる酵素反応に付すことによりトレハロースを製造することができる。反応は、反応に悪影響を及ぼさない溶媒中で行われる。該溶媒としては、例えばリン酸緩衝液等の水系の溶媒が好ましい。

【0020】トレハロースホスホリラーゼの使用量は、該酵素の活性、反応条件等により適宜選択される。具体的には、例えば $\beta$ -グルコース 1-リン酸1モルに対し、約0.05単位以上、好ましくは約0.05から10000単位、特に好ましくは約0.1から5000単位用いる。グルコースの使用量は、 $\beta$ -グルコース 1-リン酸1モルに対し、約0.1モル以上、好ましくは約0.1~3.5モル、特に好ましくは約0.5~2モルを用いる。反応液のpHは、約5.5~8.0、さらに約6.0~7.5であることが好ましい。反応温度は、約20~40℃、さらに約25~37℃であることが好ましい。反応時間は、1時間以上、通常は、約1時間~3日、特に好ましくは約2時間~2日である。

【0021】トレハロースを本発明のトレハロースホスホリラーゼを用いる酵素反応に付すことにより $\beta$ -グルコース 1-リン酸を製造することができる。反応は、リン酸類 (例、リン酸水素二カリウム等のリン酸アルカリ金属塩など) の存在下、反応に悪影響を及ぼさない溶媒中で行われる。該溶媒としては、例えばリン酸緩衝液等の水系の溶媒が好ましい。トレハロースホスホリラーゼの使用量は、該酵素の活性、反応条件等により適宜選択される。具体的には、例えばトレハロース1モルに対し、約0.05単位以上、好ましくは約0.05から10000単位、特に好ましくは約0.1から5000単位用いる。リン酸類は、トレハロース1モルに対し、約

## 11

0.1モル以上、好ましくは約0.1~3.5モル、特に好ましくは約0.5~2モルを用いる。反応液のpHは、約5.0~7.5、さらに約5.5~7.0であることが好ましい。反応温度は、約20~40℃、さらに約25~37℃であることが好ましい。反応時間は、1時間以上、通常は、約1時間~3日、特に好ましくは約2時間~2日である。

## 【0022】

【実施例】以下に実施例をもって本発明をより具体的に説明するが、これらはいずれも本発明の範囲を限定するものではない。

## 【0023】実施例1

寒天斜面培地（グルコース10g/L、トリプチケースイブロス30g/Lおよび寒天20g/L）上に生育したマイクロカス ヴェリアンス No. 39株（IFO 15442, FERM BP-4238）の白金耳を種培養用培地（グルコース 10g/L、トリプティケイブロス 30g/L）20mlを含む200ml容三角フラスコに接種し、これを32℃、18時間ロータリーシェーカー（200rpm）上で培養した。この培養液125mlを主培養用培地（グルコース 15g/L、リン酸水素二アンモニウム 1g/L、リン酸水素二カリウム 2g/L、硫酸マグネシウム 4g/L、コーン・ステアー・リカー（CSL）8g/L、チアミン塩酸塩 10mg/L、ビオチン 0.01mg/L、p-アミノ安息香酸 0.2mg/L、ニコチンアミド 20mg/L pH 7.5）2.5 Lを含む5リットルジャーファーマンターに移植し、通気量1.25L/min、攪拌回転数800rpmの条件で32℃、24時間培養した。培養終了後、培養液を5,000 X g で10分間遠心分離し、集めた菌体を0.1M リン酸一カリウム-リン酸二カリウム緩衝液（pH 7.0）で一回洗浄した。以降の操作はすべて氷冷下ないしは4℃で行った。なお各精製段階におけるタンパク質量はプロテインアッセイ（日本バイオラッドラボラトリーズ）を用いる色素結合法により測定した。培養終了液2.5 Lより集めた165g（湿重量）の菌体を終濃度250mg/ml（湿重量）になるように、0.1M フェニルメチルスルホンフルオリド（PMSF）を含む0.1M リン酸一カリウム-リン酸二カリウム緩衝液（pH 7.0）に懸濁し、ダイノミル〔KDL型、ウイリー・エー・バコフェン・マニファクチュアリング・エンジニアーズ（Willy A. Bachofen Manufacturing Engineers）、スイス）に2回通過させることにより細胞を破碎した。この破碎液を25,000 X gで20分間遠心して得られた上清液（660ml）を無細胞抽出液とした。この無細胞抽出液に硫酸アンモニウムを25%（W/V）飽和になるように添加し、氷冷水中に30分間

## 12

静置した後、25,000 X gで20分間で遠心分離した。この上清液に硫酸アンモニウムを45%（W/V）飽和になるように加え、氷冷水中に30分間静置した後25,000 X gで20分間で遠心分離し得られた沈澱物を20mM リン酸一カリウム-リン酸二カリウム緩衝液（pH 7.0）に溶解し終液量を100mlとした。この溶液を攪拌しながら、4%（W/V）硫酸プロタミン液2ml（タンパク質1mgに対して約0.1mg）を滴下し、氷冷水中に15分間静置した後、27,700 X gで20分間遠心分離した。この上清液（100ml）に硫酸アンモニウムを60%（W/V）飽和になるように添加して氷冷水中に30分間静置し沈澱を生じせしめ、25,000 X gで20分間で遠心分離した。得られた沈澱を0.3M 塩化カリウムを含む20mM リン酸一カリウム-リン酸二カリウム緩衝液（pH 7.0）70mlに溶解し、同じ緩衝液（pH 7.0：2L）に対して一晚透析した。透析後これをミリポアフィルター（0.45μm）でろ過した後、0.3M 塩化カリウムを含む20mM リン酸一カリウム-リン酸二カリウム緩衝液（pH 7.0）で平衡化したTSKgel DEAE-5PWカラム（2 X 15 cm, 東ソー社製）に負荷し、トレハロースホスホリラーゼを吸着させた。カラムを150mlの0.3M 塩化カリウムを含む20mM リン酸一カリウム-リン酸二カリウム緩衝液で洗浄した後、塩化カリウム濃度を0.3Mから0.7Mに直線的に増加させることにより吸着区分を順次溶出させた。なお分離は、5 ml/minの流速で行い、タンパク質の検出には紫外線（波長：280nm）を使用した。溶出した画分からトレハロースホスホリラーゼ活性を示す画分を集め、これに硫酸アンモニウムを加え60%（W/V）飽和とした。生じた沈澱を、遠心分離操作により集め、0.1M リン酸一カリウム-リン酸二カリウム緩衝液（pH 7.0）に溶解し2.7mlの溶液とした。次いでこの溶液を、あらかじめ、0.1M リン酸一カリウム-リン酸二カリウム緩衝液（pH 7.0）で平衡化したTSKgel G4000SWカラム（0.75 X 30 cm, 東ソー社製）に負荷し、0.2 ml/minの流速でゲルろ過を行った。得られたトレハロースホスホリラーゼ活性画分（3.2ml）をウルトラフリーCL-LTK〔分画分子量30,000, ミリポア（MILLIPORE）社製、米国〕を用いて1.9 mlに濃縮した後、SDS-PAGEを行ったところ単一なバンドを与えた。各精製段階における流量・総タンパク量・総活性量・比活性・活性回収率・精製倍率を〔表2〕に示した。活性回収率は無細胞抽出液に対して約35%、精製酵素の比活性は18.2ユニット/mg タンパク質で無細胞抽出液のその約300倍に上昇していた。

## 【0024】

## 【表2】

精製段階	1 3 液量 (ml)	総タンパク質 (mg)	総活性 (unit)	比活性 (unit/mg)	1 4 活性 回収率 (%)	精製 倍率 (倍)
無細胞抽出液	660	3319	196	0.059	100	1
硫酸分画	100	790	173	0.219	88.3	3.7
硫酸プロタミン処理	100	701	171	0.244	87.2	4.1
DEAE-5PW	2.7	26.6	135	5.08	68.9	86.1
G4000SW	1.9	3.8	69.3	18.2	35.4	308

## 【0025】実施例2

実施例1で得られたトレハロースホスホリラーゼ(4単位)を、トレハロース(2.4mmol)、リン酸一カリウム-リン酸二カリウム緩衝液(pH 7.0, 2.4mmol)、およびTES-KOH(pH 7.0, 0.6mmol)を含む12mlの溶液に加え、30℃で18時間インキュベートした後、反応を沸騰水中で2分間加熱することにより停止させた。反応液中に生じた糖リン酸化合物をマッククレディー(McCready)らの方法に準じて単離し、最終的に80mgの白色粉末を得た。本化合物を1N過塩素酸中で沸騰水中にて10分間加熱したところ等モルのグルコースと無機リン酸を生じた。また本化合物をハネス(Hanes)らの方法〔ネーチャー(Nature), 第164巻, 1107-1112頁(1949)〕に従って1-プロパノール-アンモニア水〔28% (V/V)〕-水〔6:3:1(容量比)〕を移動相に、セルロースプレート(20 X 20 cm, ワットマン社製、米国)を固定相に用いてTLCにより分析したところ、シグマ社製β-グルコース 1-リン酸とRf値が一致するスポットを与えた。これらの結果より本酵素はトレハロースを基質としてグルコースとβ-グルコース 1-リン酸を生成する反応を触媒することが確認された。なお、本酵素反応液中に生じたグルコースおよびβ-グルコース 1-リン酸の量は、各々0.35mmol、および0.33mmol、減少したトレハロースおよび無機リン酸の量は、各々0.31mmol、および0.34mmolであった。次に、実施例1で得たトレハロースホスホリラーゼ(4単位)を、グルコース(1mmol)、β-グルコース 1-リン酸(1mmol、シグマ社製、米国)およびTES-KOH(pH 7.0, 1mmol)を含む反応液20mlに加え、上記と同様にして反応を行った。この反応終了液を5 mlに減圧濃縮した後、これを活性炭(LH2C炭、武田薬品製)カラム(1 X 10 cm)に負荷した。カラムを蒸留水約20mlで洗浄した後、吸着画分を10% (V/V)エタノールで溶出した。溶出画分(8 ml)を集め、0.25mlに減圧濃縮した後、これに終濃度80% (V/V)になるようにエタノールを少しずつ加え、4℃で一夜放置した。析出した結晶をろ過によって集め、0.2mlの蒸留水に溶解し、同様にして結晶化した結果、最終的に130mgの白色結晶を得た。本結晶の比旋光度および赤外線吸収スペクトルは、標品として用いたシグマ社(米国)製のトレハロース二水和物とよく一致した。また本結晶(19mg)に、ブタ腎臓由来トレハラーゼを作用させたところ、グルコース(10μmol)が生成した。これらの結果より、本結晶がトレハロースであることが確認された。すなわち、本酵素はグル\*50

\*コースとβ-グルコース 1-リン酸からトレハロースを生成する反応を触媒することが確認された。本酵素反応液中に生じたトレハロースおよび無機リン酸の量は、各々0.55mmol、および0.50mmol、減少したグルコースおよびβ-グルコース 1-リン酸の量は、各々0.53mmol、および0.52mmolであった。以上の結果より実施例1で得られた精製酵素はトレハロースホスホリラーゼであることが確認された。

## 【0026】実施例3

実施例1のトレハロースホスホリラーゼの理化学的性状を調べた。

## (1) 基質特異性

正反応、逆反応各々において基質特異性を調べた。その結果を〔表3〕～〔表5〕に示す。本酵素は正反応において、トレハロースを基質とするが、ネオトレハロース、マルトース、イソマルトース、ラクトース、ラミナリビオース、シュクロース、スターチおよびグリコーゲンのいずれをも基質としない。本酵素は逆反応において、β-グルコース 1-リン酸およびグルコースを基質とするが、α-グルコース 1-リン酸、グルコース 6-リン酸、α-ガラクトース 1-リン酸、フルクトース 1-リン酸、フルクトース 6-リン酸、ガラクトース、マンノース、フルクトース、キシロース、ラムノース、リボース、アラビノース、ソルビトール、グルコサミン、N-アセチルグルコサミン、3-O-メチルグルコース、2-デオキシグルコース、グルコノ-δ-ラクトンおよびグルクロン酸のいずれをも基質としない。すなわち、本発明トレハロースホスホリラーゼは、高い基質特異性を有する。

## 【0027】

## 【表3】

基 質	相対活性 (%)
トレハロース	100
ネオトレハロース	0
マルトース	0
イソマルトース	0
ラクトース	0
ラミナリビオース	0
シュクロース	0
スターチ	0
グリコーゲン	0

## 【0028】



【表4】

基 質	相対活性 (%)
$\beta$ -グルコース 1-リン酸	100
$\alpha$ -グルコース 1-リン酸	0
グルコース 6-リン酸	0
$\alpha$ -ガラクトース 1-リン酸	0
フルクトース 1-リン酸	0
フルクトース 6-リン酸	0

【0029】

【表5】

基 質	相対活性 (%)
グルコース	100
ガラクトース	0
フルクトース	0
マンノース	0
キシロース	0
ラムノース	0
リボース	0
アラビノース	0
ソルビトール	0
グルコサミン	0
N-アセチルグルコサミン	0
3-O-メチルグルコース	0
2-デオキシグルコース	0
グルコノ- $\delta$ -ラクトン	0
グルクロン酸	0

【0030】(2) 至適pHおよびpH安定性

正反応および逆反応における本酵素の至適pHおよびpH安定性を調べた。その結果を〔図1〕～〔図4〕に示す。正反応における本酵素の至適pHは約6.0～7.5、安定pH範囲は約4℃、24時間の処理でpH約5.5～7.5、逆反応における本酵素の至適pHは約5.8～7.0、安定pH範囲は約4℃、24時間の処理でpH約6.3～7.3。

(3) 至適温度および温度安定性

正反応、逆反応各々の至適温度および温度安定性を調べ

た。その結果を〔図5〕～〔図8〕に示す。本酵素の正反応における至適温度は32℃付近であり、安定温度範囲はpH 7.0、10分間の処理で30℃以下である。逆反応における至適温度、および安定温度範囲は正反応の場合とほぼ同じである。

【0031】(4) 阻害、活性化および安定化

正反応、逆反応各々に対する各種金属イオン(1mM)、各種薬剤の阻害、活性化および安定化作用を調べた。その結果を〔表6〕、〔表7〕に示す。本酵素における正反応は1mMの $\text{Cu}^{2+}$ により約80%活性が阻害される。また10mMのバリダマイシン A、0.2mMのバリドキシルアミン A、または1mMの1-デオキシノジリマイシンによりほぼ100%活性が阻害される。逆反応は1mMの $\text{Ni}^{2+}$ により約90%、 $\text{Zn}^{2+}$ または $\text{Cu}^{2+}$ によりほぼ100%活性が阻害される。

【0032】

【表6】

添加物	相対活性 (%)	
	正反応	逆反応
無添加	100	100
KCl	90	101
NaCl	88	98
$\text{NH}_4\text{Cl}$	91	96
$\text{MgCl}_2$	93	89
$\text{CaCl}_2$	91	99
$\text{CoCl}_2$	87	77
$\text{FeCl}_3$	95	96
$\text{ZnCl}_2$	93	0
$\text{ZnSO}_4$	94	0
$\text{MnCl}_2$	96	92
$\text{MnSO}_4$	96	92
$\text{CuSO}_4$	22	0
$\text{NiSO}_4$	71	12
KI	86	94
NaF	89	98

【0033】

【表7】

17

18

添加物	濃度 (mM)	相対活性 (%)		添加物	濃度 (mM)	相対活性 (%)	
		正反応	逆反応			正反応	逆反応
無添加	0	100	100	ビルビン酸	1	95	94
バリダマイシンA	10	1	—	酢酸	1	94	95
バリドキシルアミンA	0.2	0	—	乳酸	1	94	91
1-デオキシノジリマイシン	1	0	—	アセチル-CoA	1	103	92
フロリジン	1	86	—	オキサロ酢酸	1	94	96
トレハロサミン	1	95	—	クエン酸	1	94	94
3-O-メチルグルコース	1	—	97	$\alpha$ -ケトグルタル酸	1	93	85
2-デオキシグルコース	1	—	95	サイクリックAMP	1	96	94
グルコノ- $\delta$ -ラクトン	1	—	94	AMP	1	94	94
$\alpha$ -グルコース 1-リン酸	1	94	95	ADP	1	95	93
$\alpha$ -ガラクトース 1-リン酸	1	—	93	ATP	1	101	93
フルクトース 1-リン酸	1	—	92	NAD	1	93	96
グルコース 6-リン酸	1	93	93	NADP	1	92	94
トレハロース 6-リン酸	1	93	—	NADH	1	93	95
フルクトース 6-リン酸	1	93	94	NADPH	1	91	95
フルクトース 1, 6-ニリン酸	1	93	92	ニコチンアミド	0.1	90	91
UDP-グルコース	1	93	95	チアミン	0.05	91	92
ADP-グルコース	1	95	95	ピオチン	0.0035	94	—
ホスホエノールビルビン酸	1	93	92	パラアミノ安息香酸	0.001	93	—

図中 — は測定せずを意味する

#### 【0034】(5) 分子量

TSKgel G4000SWカラム、およびAsahipak GS-620カラムを用いたゲルろ過法で測定したところ、本酵素の分子量は約58万、および約57万であった。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で求めたサブユニットの分子量は約10万5千であった。

#### (6) 等電点

等電点ゲル電気泳動法により求めた本酵素の等電点は4.8であった。

#### (7) ミカエリス定数 ( $K_m$ )

本酵素のトレハロース、無機リン酸、 $\beta$ -グルコース 1-リン酸、およびグルコースに対する $K_m$ は各々10、3.1、38、および23mMであった。

#### 【0035】

【発明の効果】本発明のトレハロースホスホリラーゼは、ゲルろ過的および電気泳動的に単一であり、短時間に効率よく製造することができる。本発明のトレハロースホスホリラーゼは基質特異性が極めて高く高純度であるため副反応がほとんどなく、トレハロースの選択的定量に用い得る。また本酵素の逆反応を利用して産業上有用な物質であるトレハロースを極めて高収率で製造し得る。さらに本酵素の正反応を利用して、高価な試薬である $\beta$ -グルコース 1-リン酸を製造し得る。

#### 【0036】

##### 【図面の簡単な説明】

【図1】実施例3で調べた本発明のトレハロースホスホリラーゼの正反応における至適pHを示す。

\* 【図2】実施例3で調べた本発明のトレハロースホスホリラーゼの正反応におけるpH安定性を示す。

【図3】実施例3で調べた本発明のトレハロースホスホリラーゼの逆反応における至適pHを示す。

【図4】実施例3で調べた本発明のトレハロースホスホリラーゼの逆反応におけるpH安定性を示す。

【図5】実施例3で調べた本発明のトレハロースホスホリラーゼの正反応における至適温度を示す。

【図6】実施例3で調べた本発明のトレハロースホスホリラーゼの正反応における温度安定性を示す。

【図7】実施例3で調べた本発明のトレハロースホスホリラーゼの逆反応における至適温度を示す。

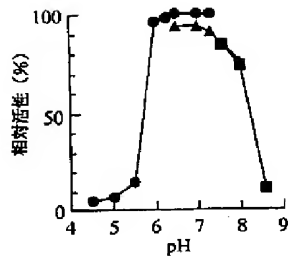
【図8】実施例3で調べた本発明のトレハロースホスホリラーゼの逆反応における温度安定性を示す。

##### 【符号の説明】

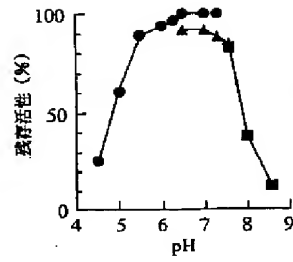
図中の黒丸はMES〔2-モルフォリノ・エタンスルホニック・アシッド(Morpholinoethane sulfonic acid)〕-水酸化カリウム緩衝液中での測定結果を、黒三角はTES〔N-トリス(ハイドロキシメチル)メチル(tris(hydroxymethyl)methyl)-2-アミノエタン・スルホニック・アシッド(aminoethane sulfonic acid)〕-水酸化カリウム緩衝液中での測定結果を、黒四角はTAPS〔N-トリス(ハイドロキシメチル)メチル(tris(hydroxymethyl)methyl)-3-アミノプロパン・スルホニック・アシッド(aminopropane sulfonic acid)〕-水酸化カリウム緩衝液中での測定結果を表す。

\*

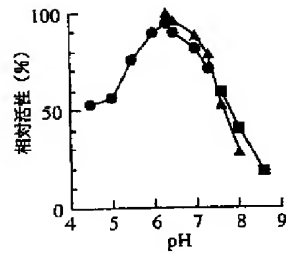
【図1】



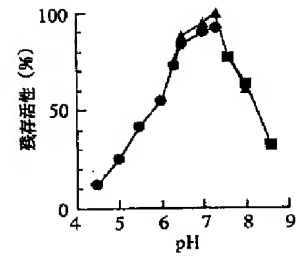
【図2】



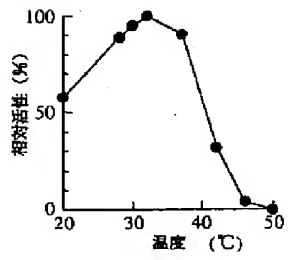
【図3】



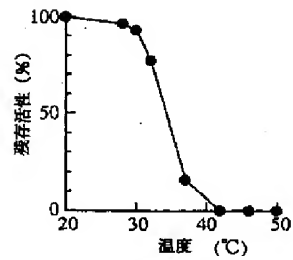
【図4】



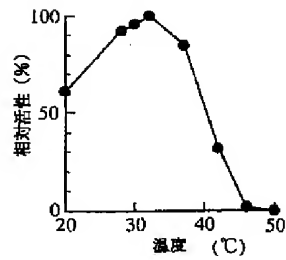
【図5】



【図6】



【図7】



【図8】

